

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

3 012 964

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

13 60999

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 9/107** (2013.01), A 61 K 39/39, A 61 P 37/04

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 12.11.13.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.05.15 Bulletin 15/20.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

☐ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : SOCIETE D'EXPLOITATION DE
PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES
SEPPIC Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : BEN AROUS JULIETTE, DUPUIS
LAURENT et LILLEHOJ HYUN.

⑦③ Titulaire(s) : SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRO-
DUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES SEPPIC
Société anonyme.

⑦④ Mandataire(s) : L'AIR LIQUIDE.

⑤④ **VACCINS ADJUVES POUR VACCINATION AVIAIRE IN OVO.**

⑤⑦ Composition comprenant au moins une huile miné-
rale, un tensioactif présentant un caractère hydrophile ca-
ractérisé par une valeur HLB égale à 12 et un sel
inorganique divalent destinée à être employée comme adju-
vant dans une composition de vaccin pour la vaccination in
ovo d'espèces aviaires caractérisée en ce que ladite com-
position est une émulsion ou microémulsion de type huile
dans eau.

FR 3 012 964 - A1



5 La présente invention concerne l'utilisation d'adjuvants pour la formulation de compositions vaccinales destinées à la prévention de maladies aviaires et destinées à être appliquées par administration *in ovo* (injection dans l'œuf), ledit adjuvant comprenant au moins une phase huileuse et au moins un sel inorganique divalent pharmaceutiquement acceptable.

10 Un adjuvant de vaccin est un excipient amplifiant la réponse immunologique contre l'antigène du vaccin auquel il est associé. Ces adjuvants sont de natures diverses. Ils peuvent aussi bien consister en des liposomes, en des émulsions comprenant au moins une phase huile et au moins une phase aqueuse, du type adjuvants dits de Freund, en des adjuvants d'origine biologique (cytokines,
15 oligonucléotides...) ou en des sels minéraux insolubles dans l'eau. Parmi les sels minéraux utilisés comme adjuvants de compositions vaccinales, on peut citer par exemple l'hydroxyde d'aluminium, qui est très couramment utilisé. Pour la formulation de compositions vaccinales contenant un antigène inactivé et destinées à l'injection d'espèces aviaires, les adjuvants de type émulsions eau dans huile sont
20 majoritairement utilisés.

L'utilisation d'adjuvants dans les compositions vaccinales permet notamment:

- d'augmenter l'intensité de la réponse protectrice conférée par une dose de vaccin, permettant d'assurer un meilleur niveau de protection;
- de prolonger la durée de la protection conférée par une dose de vaccin,
25 assurant une protection plus durable des animaux dans les élevages tout au long de leur croissance;
- d'obtenir, avec une dose antigénique moindre, une efficacité équivalente à celle conférée par une dose complète utilisée sans adjuvant. Ainsi, une entité de production de vaccin se verra, avec une même capacité productive, capable de
30 produire un nombre supérieur de doses de vaccins. De même, un conditionnement existant pourra être proposé pour vacciner un plus grand nombre d'animaux.
- de diminuer le nombre d'immunisations nécessaires pour assurer une protection vaccinale.

La prévention des maladies aviaires infectieuses d'origine virale, bactérienne ou parasitaire est cruciale pour soutenir le développement de la production avicole. La vaccination est une méthode préconisée pour la prévention d'un grand nombre de maladies des espèces aviaires, telles que la maladie de Newcastle, la grippe aviaire, la maladie de Gumboro, la maladie de Marek, la coccidiose, la bronchite infectieuse, la pasteurellose aviaire.... Les poulets de chairs vivent au plus quelques mois et reçoivent de multiples vaccins au cours de leur vie, notamment durant leurs premiers jours.

Les vaccins aviaires peuvent être administrés par injection sous cutanée ou intramusculaire chez le poussin ou l'adulte, par voie mucosale (orale, intranasale, intraoculaire), par administration de masse (nébulisation ou administration dans l'eau de boisson), ou par injection dans l'œuf quand l'embryon atteint 18 ou 19 jours après fécondation (administration *in ovo*).

La vaccination par voie injectable est utilisée classiquement pour l'administration de vaccins aviaires. Cependant, la vaccination d'un très grand nombre d'animaux représentant des coûts de main d'œuvre élevés dans les conditions d'élevage intensif, de nouvelles méthodes ont été développées plus récemment. La vaccination *in ovo* est ainsi une méthode d'administration vaccinale de plus en plus plébiscitée, car applicable directement dans les établissements de couvaie (couvoirs), et qui permet des réductions importantes de coût et de temps dédiés à la vaccination.

Les antigènes dédiés aux compositions vaccinales aviaires peuvent être constitués de pathogènes tués (vaccins inactivés), de pathogènes vivants dont la virulence a été réduite (vaccins vivants atténués), de protéines immunogènes recombinantes (vaccins sous-unitaires) ou de vecteurs vivants recombinants (vaccins vectorisés). Les vaccins vivants atténués et vectorisés sont généralement assez efficaces pour ne pas nécessiter l'ajout systématique d'adjuvants, même s'il est possible d'amplifier l'efficacité de vaccins vivants à l'aide d'adjuvants adaptés, comme décrit par exemple dans la demande de brevet WO2011/117507. A l'inverse, la formulation de vaccins inactivés et sous-unitaires nécessite généralement l'ajout d'un adjuvant d'immunité pour atteindre l'efficacité vaccinale requise.

Les vaccins commerciaux actuellement administrés *in ovo* sont des vaccins vivants atténués ne contenant pas d'adjuvant. Les vaccins vivants atténués pouvant présenter des risques de réversion de virulence, le développement de vaccins

inactivés ou sous-unitaires pour la vaccination *in ovo* est intéressant. Cependant, les compositions vaccinales aviaires contenant un antigène inactivé ou sous-unitaire et un adjuvant huileux de type eau dans huile, très largement utilisées pour l'administration par injection au poussin ou à l'adulte, ne sont pas utilisables telles
5 quelles pour une administration *in ovo*. En effet, les adjuvants huileux généralement utilisés pour la vaccination des poussins et des adultes sont toxiques pour le développement de l'embryon dans l'œuf. Le développement d'un adjuvant spécifique permettant l'utilisation d'antigènes inactivés *in ovo* est donc nécessaire.

10 Un adjuvant destiné à l'administration *in ovo* doit donc présenter les caractéristiques spécifiques suivantes :

- être non toxique pour le développement de l'embryon aviaire ;
- être compatible avec les vaccins vivants atténués (non virucide) ;
- augmenter la protection conférée par l'antigène vaccinal, selon les modalités décrites précédemment.

15 Diverses technologies adjuvantes ont déjà été testées pour la vaccination *in ovo*, telles que les sels d'hydroxyde d'aluminium, les polymères de type carbomères, les adjuvants d'origine biologique, tels que les CPG, les cytokines et chemokines, la saponine. Cependant il n'existe pas de consensus et le développement de nouvelles formulations adjuvantes efficaces et à coût compatible pour la vaccination *in ovo*
20 reste nécessaire.

En ce qui concerne les vaccins aviaires injectables chez le poussin ou l'adulte, les technologies adjuvantes les plus efficaces sont les émulsions de type eau dans huile composées d'une phase aqueuse et d'une phase huileuse basée sur une huile minérale. Aucun adjuvant basé sur des émulsions huileuses n'a pourtant été trouvé
25 efficace pour la vaccination *in ovo* jusqu'ici, notamment en raison de problèmes de toxicité.

Il a été montré précédemment que les adjuvants de type émulsion ou microémulsion huile dans eau sont compatibles avec les vaccins vivants et peuvent être utilisés comme adjuvants d'immunité pour les vaccins vivants (demande de
30 brevet WO2011/117507). Cependant, parmi ces technologies, il a été montré que la plupart des adjuvants de cette famille sont toxiques pour le développement embryonnaire dans l'œuf.

C'est pourquoi il existe un besoin de mettre en œuvre des adjuvants contenant une émulsion huile dans eau possédant les caractéristiques requises, comme:

- ne pas être toxiques pour le développement embryonnaire des poussins ;
- 5 - être capable d'augmenter la protection donnée par un antigène sous-unitaire dédié à la vaccination aviaire administré *in ovo*.

La présente invention a donc pour objet une composition comprenant au moins une huile minérale, un tensioactif présentant un caractère hydrophile caractérisé par une valeur HLB égale à 12 et un sel inorganique divalent destinée à
10 être employée comme adjuvant dans une composition de vaccin pour la vaccination *in ovo* d'espèces aviaires caractérisée en ce que ladite composition est une émulsion ou microémulsion de type huile dans eau.

Par ailleurs, des modes de réalisation de l'invention peuvent comporter l'une ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

15 Une composition telle que définie précédemment, comprenant pour 100% de sa masse:

- de 50% à 97% d'eau, plus particulièrement de 70% à 97% d'eau, et encore plus particulièrement de 80% à 97% d'eau;
- de 1% à 45% d'adjuvant huileux, plus particulièrement de 1% à 30%
20 d'adjuvant huileux, et encore plus particulièrement de 2% à 10% d'adjuvant huileux;
- de 0,1% à 10% d'au moins un sel inorganique divalent, plus particulièrement de 0,1% à 8%, et encore plus particulièrement de 0,2% à 3%;
- de 0% à 10% d'au moins un agent complexant, plus particulièrement de 0% à 8%, et encore plus particulièrement de 0% à 3%.

25 Une composition telle que définie précédemment, caractérisée en ce que ledit adjuvant huileux comprend pour 100% de sa masse:

- de 40% à 95% d'au moins une huile minérale, plus particulièrement de 50% à 95% d'au moins une huile minérale, et encore plus particulièrement de 50% à 90% d'au moins une huile minérale;
- 30 - de 5% à 60% d'au moins un tensioactif, plus particulièrement de 5% à 50% d'au moins un tensioactif, et encore plus particulièrement de 10% à 50% d'au moins un tensioactif.

Une composition telle que définie précédemment, caractérisée en ce que ledit au moins un sel inorganique divalent est choisi parmi le gluconate de manganèse, le

gluconate de calcium, l'aspartate de calcium, le gluconate de zinc, le gluconate de fer, le chlorure de calcium.

Une composition telle que définie précédemment, caractérisée en ce que le dit au moins un agent complexant est choisi parmi l'acide éthylène diamine tétra
5 acétique (EDTA), le gluconate de sodium, le gluconate de potassium et le polyacrylate de sodium.

Une composition telle que définie précédemment, caractérisée en ce que le tensioactif est un ester de sucre éthoxylé.

Une composition telle que définie précédemment, caractérisée en ce que
10 l'huile minérale est une huile de vaseline blanche de qualité injectable.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une composition vaccinale destinée à la vaccination *in ovo* d'espèces aviaires comprenant au moins un antigène et une composition adjuvante d'immunité telle que définie précédemment.

Par ailleurs, des modes de réalisation de l'invention peuvent comporter l'une
15 ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

Une composition telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que l'antigène contient au moins une protéine sous unitaire recombinante.

Une composition telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que ladite protéine sous unitaire est une protéine d'*Eimeria*, plus particulièrement d'*Eimeria*
20 *acervulina* et plus particulièrement la profiline 3-1E, à but de protection contre la coccidiose aviaire.

Une composition telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la dite protéine sous unitaire est une protéine de *Clostridium perfringens*, plus particulièrement la toxine NetB, ou la toxine alpha, les protéines pyruvate ferredoxin
25 oxydoreductase (PFO), ou elongation factor-Tu (EF-Tu), à but de protection contre l'entérite nécrotique.

Une composition telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que ledit antigène contient au moins une protéine de *Clostridium perfringens*, plus particulièrement la toxine NetB, ou la toxine alpha, les protéines pyruvate ferredoxin
30 oxydoreductase (PFO), ou elongation factor-Tu (EF-Tu), et une protéine d'*Eimeria*, plus particulièrement d'*Eimeria acervulina* et plus particulièrement la profiline 3-1E, à but de protection contre la coccidiose aviaire et l'entérite nécrotique aviaire.

Une composition telle que définie ci-dessus, comprenant au moins un antigène vivant antiparasitaire de la coccidiose.

Une composition telle que définie ci-dessus, comprenant au moins un antigène vivant utilisé dans les vaccinations aviaires.

Par microémulsion, on comprend une dispersion thermodynamiquement stable de deux liquides immiscibles, stabilisée par un (ou plusieurs) tensioactif(s).

- 5 Ces dispersions sont en général transparentes car les tailles typiques des mésophases sont inférieures à la longueur d'onde de la lumière, et souvent nanométriques.

Un exemple est donné par la dispersion aqueuse de petites gouttelettes d'huiles stabilisées par des tensioactifs. De par leur diamètre (quelques dizaines de
10 nanomètres), elles sont invisibles à l'œil nu et même au microscope. Leur taille peut être mesurée par des techniques microscopiques comme la diffusion de rayonnement aux petits angles.

Les émulsions ou microémulsions objet de la présente invention ont une couleur à l'échelle macroscopique sur une gamme allant de bleuté à blanc.

- 15 Les huiles minérales utilisées pour la préparation des adjuvants huileux sont sélectionnées dans le groupe constitué par les huiles minérales, hydrocarbures, obtenues par distillation du pétrole et par la mise en œuvre d'étapes de traitement subséquentes comme par exemple les étapes de désulfurisation, de désasphaltage, d'extraction des composés aromatiques, d'extraction des cires, et autres étapes de
20 traitement de finition (on peut citer par exemple les huiles du type MARCOL 52, MARCOL 82, DRAKEOL 5, DRAKEOL 6, EOLANE 170...).

Les tensioactifs présents dans les adjuvants huileux sont des tensioactifs émulseurs, présentant un caractère hydrophile caractérisé par une valeur HLB comprise entre 8 et 15. De préférence sa valeur HLB est égale à 12. Un tel
25 tensioactif peut consister en un alkylpolyglycoside ou un mélange d'alkylpolyglycosides; des saponines; des lécithines; des alcanols polyoxyéthylés; des polymères comprenant des blocs polyoxyéthylènes et polyoxypropylènes; des esters obtenus par condensation d'un acide gras, avantageusement un acide gras liquide à 20°C avec un sucre, du sorbitol, du mannitol ou du glycérol. Ledit sucre
30 peut consister en du glucose ou du saccharose ou, de préférence, mannitol. A titre d'esters préférés, on peut citer les esters d'acides gras, comme par exemple l'acide oléique, l'acide stéarique, l'acide palmitique, l'acide laurique, et de sorbitol ou de mannitol, obtenus par estérification de l'acide gras avec le sorbitol ou le mannitol, ou bien par estérification avec les produits résultant de l'anhydrisation de la chaîne

polyhydroxylée du sorbitol ou du mannitol qui se cyclise en position 1-4 ou en position 2-6, ou bien par estérification avec le sorbitol ou le mannitol et avec les produits résultant de l'anhydrisation de la chaîne polyhydroxylée du sorbitol ou du mannitol qui se cyclise en position 1-4 ou en position 2-6. Comme esters de mannitol
5 particulièrement préférés, on peut citer les oléates de mannitol, les oléates de mannitan, les oléates de mannitol éthoxylés à 5 moles ou 10 moles ou 15 moles ou 20 moles d'oxyde d'éthylène, les oléates de mannitan éthoxylés à 5 moles ou 10 moles ou 15 moles ou 20 moles d'oxyde d'éthylène. Des dérivés d'esters de sucre de polyéthylèneglycol, de sorbitol ou de glycérol peuvent être également mis en
10 œuvre. Les autres types de tensioactifs préférés consistent en des huiles végétales éthoxylées, comme par exemple des huiles de maïs éthoxylées ayant entre 3 moles et 40 moles d'oxyde d'éthylène, des huiles de colza éthoxylées ayant entre 3 moles et 40 moles d'oxyde d'éthylène, des huiles de ricin éthoxylées ayant entre 3 moles et 60 moles d'oxyde d'éthylène.

15 L'invention sera mieux comprise au regard des exemples et figures ci-après.

Exemples

Exemple 1 : Compatibilité des adjuvants avec le développement embryonnaire aviaire

20 Pour mesurer la compatibilité des adjuvants avec la vaccination *in ovo* d'embryons de poulet, différents adjuvants de type émulsion huile dans eau, compatibles avec différents vaccins vivants atténués, ont été formulés en vaccins placebo (phase aqueuse : PBS). 0,1ml de chacune de ces formules placebos ont été injectés à l'aide d'un injecteur Intelliject (Avitech) et d'une aiguille de 17,5cm et 18-
25 gauge dans la cavité amniotique d'œufs fertilisés de 18 jours.

La toxicité est mesurée comme le nombre de poussins éclos après injection avec un vaccin placebo adjuvé par rapport au nombre de poussins éclos après injection avec 0,1ml de PBS non adjuvé. Pour comparaison, un placebo basé sur un adjuvant aviaire de référence de type émulsion eau dans huile, utilisé pour la
30 vaccination des poulets adultes, a été inclus dans le test. Deux séries d'essais ont été réalisés, les résultats sont présentés ci-dessous.

Essai 1:

Groupe	Adjuvant	Composition du vaccin	Nombre d'œufs injectés	Nombre de poussins éclos	% d'éclosion par rapport au contrôle non adjuvé
1	Non adjuvé	PBS	25	13	Reference 100%
2	Emulsion 1	Huile minérale 1 Système tensioactif 1 Sel divalent % adjuvant sec: 12%	25	15	115%
3	Emulsion 2	Huile minérale 2 Système tensioactif 1 Sel divalent complexant EDTA % adjuvant sec: 6%	25	14	108%
4	Emulsion 3	Huile minérale 1 Système tensioactif 1 Sel divalent complexant EDTA % adjuvant sec: 12%	25	14	108%
5	Emulsion 4	Huile minérale 1 Système tensioactif 2 sel divalent complexant EDTA % adjuvant sec: 6%	25	11	85%
6	Emulsion 5	Huile minérale 1 Système tensioactif 1 % adjuvant sec: 15%	25	6	46%
7	Emulsion 6	Huile minérale 2 Système tensioactif 2 % adjuvant sec: 15%	25	6	46%
8	Contrôle : Emulsion eau dans huile minérale	% adjuvant sec: 70%	25	8	62%

Les groupes 2 à 5 utilisent les émulsions 1 à 4. Dans ces compositions, la fraction non aqueuse représente en final dans le vaccin préparé un pourcentage allant de 6 à 12% (huile + tensioactif + sels). Le tensioactif 1 est de la famille des esters de sucre éthoxylé. Le tensioactif 2 est de la famille des alcools gras éthoxylés.

- 5 Les huiles minérales 1 et 2 sont des huiles de vaseline blanche de qualité injectable (par exemple: Marcol 52® de Exxon). Le sel divalent est un sel de manganèse ou de calcium. Le schéma de formule type est une base (huile minérale + tensioactif HLB12) représentant 10% auxquels s'ajoutent 2% de sels dans une solution aqueuse qsp 100%. Ces préparations permettent d'obtenir un taux de natalité non
- 10 significativement différent du groupe injecté sans adjuvant (groupe 1) indiquant une bonne tolérance. Les groupes 6 à 8, de compositions qualitative et quantitative proches, induisent de fortes mortalités (taux de natalité entre 46 et 62%). Ces formules sont basées sur des mélanges huiles + tensioactifs seulement.

15 **Essai 2:**

Groupe	Adjuvant (% d'adjuvant / PBS)	Dose	Nombre d'oeufs injectés	Nombre de poussins éclos	% d'éclosion par rapport au contrôle non adjuvé
1	PBS/ Non adjuvé	100µl	17	9	-
2	Emulsion 1	100µl	17	12	133%
3	Emulsion 3	100µl	17	11	122%
5	Contrôle : Emulsion eau dans huile	100µl	16	5	55%

Remarque : le nombre de poussin éclos est équivalent pour les groupes 1 à 3. Il est significativement plus faible pour le groupe 5.

- Dans cet essai, on confirme que des émulsions de type 2 et 3 sont compatibles avec la vaccination *in ovo* en n'induisant pas de mortalité ; l'émulsion
- 20 E/H induit une forte mortalité et n'est pas compatible avec cette application dans les conditions testées.

Ces deux essais montrent que seuls les adjuvants contenant une émulsion et un sel divalent pharmaceutiquement acceptable sont compatibles avec le développement embryonnaire aviaire.

Exemple 2 : 1^{er} essai d'efficacité : Modèle de vaccin *in ovo* recombinant contre la coccidiose

L'efficacité des adjuvants sélectionnés après les tests d'innocuité a ensuite été testée sur un modèle de vaccin sous-unitaire contre la coccidiose injecté *in ovo*. La coccidiose est une maladie aviaire parasitaire entérique causée par les parasites du genre *Eimeria*.

Il a été montré précédemment que la vaccination par injection de poulets avec un vaccin sous-unitaire adjuvé à l'aide d'un adjuvant eau dans huile et comprenant comme antigène la profiline 3-1E d'*Eimeria acervulina* recombinante permettait d'induire une protection homologue contre une infection par *E. acervulina* et une cross-protection contre les 2 autres souches majeures d'*Eimeria* responsables de la coccidiose (*E. maxima*, *E. tenella*).

Dans ce cas, l'antigène seul n'est pas assez immunogène pour induire une protection, et l'ajout de l'adjuvant est requis [cf S.I. Jang, H.S. Lillehoj, S.H. Lee, K.W. Lee, E.P. Lillehoj, F. Bertrand, L. Dupuis, S. Deville. Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. Experimental Parasitology 127 (2011) 178–183. Ainsi que S.I. Jang, D.K. Kim, H.S. Lillehoj, S.H. Lee, K.W. Lee, F. Bertrand, L. Dupuis, S. Deville, J. Ben Arous, E. P. Lillehoj Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG Adjuvant during Profilin Vaccination against Experimental Coccidiosis. PLoS ONE 8(4) (2013) e59786].

L'antigène 3-1E d'*Eimeria acervulina* (50µg/dose) a donc été combiné avec les adjuvants sélectionnés à l'étape précédente pour une injection *in ovo*.

Les groupes de vaccination sont présentés ci-dessous. 0,1ml de chacun de ces vaccins ont été injectés à l'aide d'un injecteur Intelliject (Avitech) et d'une aiguille de 17,5cm et 18-gauge dans la cavité amniotique d'œufs fertilisés de 18 jours.

Groupe	Vaccin	Dose	Nombre d'oeufs injectés	Nombre de poussins éclos	Infection
1	PBS	100µl	15	14	Aucune
2	PBS	100µl	15	13	E.A. 10000
3	Antigène 3-1E	50µg/100µl	15	11	E.A. 10000
4	Antigène 3-1E + Emulsion 1	50µg/100µl	15	11	E.A. 10000
5	Antigène 3-1E + Emulsion 3	50µg/100µl	15	12	E.A. 10000

Remarque : le nombre de poussins éclos est équivalent pour les groupes 1 à 5.

5 Après éclosion, les poulets vaccinés *in ovo* sont soumis à une épreuve infectieuse à 18 jours post vaccination (15 jours après éclosion) par inoculation dans l'œsophage de 10000 oocytes sporulés d'*Eimeria acervulina*. La résistance à l'infection est mesurée par l'enregistrement de la prise de poids après infection, le comptage des oocytes excrétés, la mesure des lésions intestinales et la réponse sérologique anti-profiline 3-1E.

10 Les résultats sont analysés statistiquement par analyse ANOVA. Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0.05$. Deux valeurs significativement différentes sont représentées par des lettres différentes.

Résultats :

1- Prise de poids :

15 La prise de poids est mesurée entre le jour de l'infection et 10 jours après infection :

Groupe	PBS Non infecté	PBS Infecté	Antigène Non adjuvé	Antigène + Emulsion 1	Antigène + Emulsion 3
Moyenne (g)	752 ^a	672 ^c	683 ^c	730 ^b	700 ^c
Ecart type (g)	35	51	45	34	31

2- Lésions intestinales:

Le score des lésions intestinales spécifiques causées par la coccidiose représente la moyenne des scores donnés par trois observateurs indépendants. Les lésions sont notées de 1 à 4, dans l'ordre croissant de sévérité de la lésion.

	PBS Infecté	Antigène Non adjuvé	Antigène + Emulsion 1	Antigène + Emulsion 3
Score moyen	2.5 ^a	2.5 ^a	1.5^b	1.5^b
Ecart type	0.58	0.58	0.58	0.58

5

3- Excrétion fécale d'oocytes:

Les fèces de chaque groupe ont été récoltées entre le 6^{ème} et le 10^{ème} jour après infection, et les oocytes d'*Eimeria* excrétés après infection ont été comptés.

	PBS Infecté	Antigène Non adjuvé	Antigène + Emulsion 1	Antigène + Emulsion 3
Moyenne (x10⁸/animal)	2.93 ^a	2.71 ^a	2.43^b	2.11^b
Ecart type	0.47	0.24	0.24	0.41

10

4- Anticorps sériques anti-3-1E:

Les anticorps sériques spécifiques contre la profiline 3-1E ont été mesurés par prélèvement de sang et analyse ELISA avant infection 18 jours après immunisation. Les résultats sont illustrés sur la figure 1.

Conclusion du 1^{er} essai d'efficacité:

15

Les résultats obtenus montrent que les adjuvants de type émulsion huile dans eau contenant un sel divalent, complexé ou non, sont compatibles avec la vaccination *in ovo* et augmente la protection contre la coccidiose conférée par un antigène sous-unitaire. Les animaux des groupes adjuvés montrent après infection une prise de poids plus élevée, une excrétion parasitaire et des lésions intestinales plus faibles que les animaux vaccinés avec l'antigène non adjuvé. Ils montrent aussi des titres d'anticorps sériques spécifiques de l'antigène plus élevés que les animaux vaccinés avec l'antigène non adjuvé. Le vaccin non adjuvé ne permet pas de protection contre la coccidiose.

20

Exemple 3 : 2nd essai d'efficacité : Modèle de vaccin *in ovo* recombinant bivalent contre la coccidiose et l'entérite nécrotique

Dans un second temps, l'efficacité des adjuvants sélectionnés a été testée sur un modèle de vaccin sous-unitaire divalent contre la coccidiose et l'entérite
5 nécrotique injecté *in ovo*.

La coccidiose est une maladie aviaire parasitaire entérique causée par les parasites du genre *Eimeria*.

L'entérite nécrotique est une maladie aviaire entérique bactérienne, causée par la bactérie *Clostridium perfringens*, et potentialisée par la présence d'une pré-
10 infection par *Eimeria*.

Il a été montré précédemment que la vaccination par injection de poulets avec un vaccin sous-unitaire adjuvé comprenant comme antigène la toxine NetB de *Clostridium perfringens* recombinante permettait d'induire une protection contre une infection par *Clostridium perfringens*.

15 L'antigène NetB seul n'est pas assez immunogène pour induire une protection, et l'ajout d'un adjuvant est requis [cf S.I. Jang, H.S. Lillehoj, S.H. Lee, K.W. Lee, E.P. Lillehoj, Y.H. Hong, D.J. An, W. Jeong, J.E. Chun, F. Bertrand, L. Dupuis, S. Deville, J. Ben Arous - Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide™ ISA 71 VG adjuvant increases
20 protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. Vaccine 30 (2012) 5401-5406].

L'antigène 3-1E d'*Eimeria acervulina* (50 µg/dose) et l'antigène NetB (50 µg/dose) de *Clostridium perfringens* ont donc été combinés avec les adjuvants sélectionnés pour une injection *in ovo*.

25 Les groupes de vaccination sont présentés ci-dessous. 0.1ml de chacun de ces vaccins ont été injectés à l'aide d'un injecteur Intelliject (Avitech) et d'une aiguille de 17,5cm et 18-gauge dans la cavité amniotique d'œufs fertilisés de 18 jours.

Groupe	Vaccin	Dose	Nombre d'oeufs injectés	Nombre de poussins éclos	Infection
1	PBS	100µl	15	11	aucune
2	PBS	100µl	15	10	EM 10,000 C.P 1×10 ⁹ CFU
3	3-1E Non adjuvé	100µl	15	9	EM 10,000 C.P 1×10 ⁹ CFU
4	3-1E + NetB Non adjuvé	50µg/100µl	15	7	EM 10,000 C.P 1×10 ⁹ CFU
5	3-1E + NetB + Emulsion 1	50µg/100µl	15	7	EM 10,000 C.P 1×10 ⁹ CFU
7	3-1E + NetB + Emulsion 3	50µg/100µl	15	7	EM 10,000 C.P 1×10 ⁹ CFU

Remarque : le nombre de poussins éclos est considéré comme équivalent pour tous les groupes.

Après éclosion, les poulets vaccinés *in ovo* (5 poulets/groupe) sont soumis à une épreuve infectieuse à 18 jours post vaccination (15 jours après éclosion) par inoculation dans l'œsophage de 10000 oocytes sporulés d'*Eimeria acervulina*, puis 3 jours après (21 jours après vaccination) à une infection par 10⁹ CFU de *C. perfringens*.

La résistance à l'infection est mesurée par l'enregistrement de la prise de poids après infection, la mesure des lésions intestinales, la réponse sérologique anti-toxine NetB, et la prolifération des splénocytes après restimulation par la toxine NetB.

Les résultats sont analysés statistiquement par analyse ANOVA. Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0.05$. Deux valeurs significativement différentes sont notées par des lettres différentes.

Résultats :1- Prise de poids :

La prise de poids est mesurée entre le jour de l'infection par *Eimeria* (j18 post vaccination) et 2 jours après infection par *Clostridium* (j23 post vaccination).

5

	PBS Infecté	3-1E Non adjuvé	3-1E / NetB Non adjuvé	3-1E / NetB Emulsion 1	3-1E / NetB Emulsion 3
Moyenne (g)	223 ^c	231 ^c	223 ^c	245^b	247^b
Ecart type (g)	31	31	17	27	22

2- Lésions intestinales :

Le score des lésions intestinales spécifiques représente la moyenne des scores donnés par trois observateurs indépendants. Les lésions sont notées de 1 à 4, dans l'ordre croissant de sévérité de la lésion.

10

	PBS Infecté	3-1E Non adjuvé	3-1E/NetB Non adjuvé	3-1E/NetB Emulsion 1	3-1E/NetB Emulsion 3
Score moyen	2.5 ^a	2.5 ^a	2.25 ^a	1.5^b	1.5^b
Ecart type	0.58	0.58	0.50	0.58	0.58

3- Anticorps sériques anti-NetB :

Les anticorps sériques spécifiques contre la toxine NetB ont été mesurés par prélèvement de sang et analyse ELISA avant infection par *E. acervulina* et *C. perfringens*, à j18 après vaccination. Les résultats sont illustrés sur la figure 2.

15

4- Prolifération spécifique des splénocytes par restimulation par NetB :

La réponse cellulaire induite par la vaccination a été mesurée par reprobifération des lymphocytes de la rate en présence de NetB.

20

Pour 2 animaux/groupe, la rate a été prélevée 16 jours après immunisation (avant infection). Les splénocytes ont été isolés puis restimulés en présence de NetB pour 48h. La reproductibilité est présentée par un indice de stimulation. Les résultats sont illustrés sur la figure 3.

5

Conclusion du 2nd essai d'efficacité:

Les résultats obtenus montrent que les adjuvants de type émulsion huile dans eau contenant un sel divalent objet de l'invention, complexés ou non, sont compatibles avec la vaccination *in ovo* et augmentent la protection contre l'entérite nécrotique conférée par un antigène sous-unitaire. Les animaux des groupes adjuvés montrent après infection une prise de poids plus élevée, des lésions intestinales plus faibles que les animaux vaccinés avec l'antigène non adjuvé. Ils montrent aussi des titres d'anticorps sériques et des indices de restimulation lymphocytaire spécifiques de l'antigène plus élevés que les animaux vaccinés avec l'antigène non adjuvé. Dans ce cas, le vaccin non adjuvé ne permet pas d'obtenir une protection contre l'infection par *C. perfringens*.

10

15

Revendications

- 5 1. Composition comprenant au moins une huile minérale, un tensioactif
présentant un caractère hydrophile caractérisé par une valeur HLB égale à 12 et un
sel inorganique divalent destinée à être employée comme adjuvant dans une
composition de vaccin pour la vaccination *in ovo* d'espèces aviaires caractérisée en
ce que ladite composition est une émulsion ou microémulsion de type huile dans
10 eau.
2. Composition selon la revendication précédente comprenant pour 100% de
sa masse:
- de 50% à 97% d'eau, plus particulièrement de 70% à 97% d'eau, et
15 encore plus particulièrement de 80% à 97% d'eau;
 - de 1% à 45% d'adjuvant huileux, plus particulièrement de 1% à 30%
d'adjuvant huileux, et encore plus particulièrement de 2% à 10% d'adjuvant huileux;
 - de 0,1% à 10% d'au moins un sel inorganique divalent, plus
particulièrement de 0,1% à 8%, et encore plus particulièrement de 0,2% à 3%;
 - 20 - de 0% à 10% d'au moins un agent complexant, plus particulièrement de
0% à 8%, et encore plus particulièrement de 0% à 3%.
3. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que
ledit adjuvant huileux comprend pour 100% de sa masse:
- 25 - de 40% à 95% d'au moins une huile minérale, plus particulièrement de
50% à 95% d'au moins une huile minérale, et encore plus particulièrement de 50% à
90% d'au moins une huile minérale;
 - de 5% à 60% d'au moins un tensioactif, plus particulièrement de 5% à
50% d'au moins un tensioactif, et encore plus particulièrement de 10% à 50% d'au
30 moins un tensioactif.

4. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que ledit au moins un sel inorganique divalent est choisi parmi le gluconate de manganèse, le gluconate de calcium, l'aspartate de calcium, le gluconate de zinc, le gluconate de fer, le chlorure de calcium.

5

5. Composition selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que le dit au moins un agent complexant est choisi parmi l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), le gluconate de sodium, le gluconate de potassium et le polyacrylate de sodium.

10

6. Composition selon l'une des revendications 3 à 5 caractérisée en ce que le tensioactif est un ester de sucre éthoxylé.

7. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'huile minérale est une huile de vaseline blanche de qualité injectable.

15

8. Composition vaccinale destinée à la vaccination *in ovo* d'espèces aviaires comprenant au moins un antigène et une composition adjuvante d'immunité telle que définie aux revendications 1 à 7.

20

9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'antigène contient au moins une protéine sous unitaire recombinante.

10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite protéine sous unitaire est une protéine d'*Eimeria*, plus particulièrement d'*Eimeria acervulina* et plus particulièrement la profiline 3-1E, à but de protection contre la coccidiose aviaire.

25

11. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que la dite protéine sous unitaire est une protéine de *Clostridium perfringens*, plus particulièrement la toxine NetB, ou la toxine alpha, les protéines pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFO), ou elongation factor-Tu (EF-Tu), à but de protection contre l'entérite nécrotique.

30

12. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit antigène contient au moins une protéine de *Clostridium perfringens*, plus particulièrement la toxine NetB, ou la toxine alpha, les protéines pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFO), ou elongation factor-Tu (EF-Tu), et une protéine d'*Eimeria*,
5 plus particulièrement d'*Eimeria acervulina* et plus particulièrement la profiline 3-1E, à but de protection contre la coccidiose aviaire et l'entérite nécrotique aviaire.

13. Composition selon la revendication 12, comprenant au moins un antigène vivant antiparasitaire de la coccidiose.
10

14. Composition selon la revendication 13, comprenant au moins un antigène vivant utilisé dans les vaccinations aviaires.

15

1/2

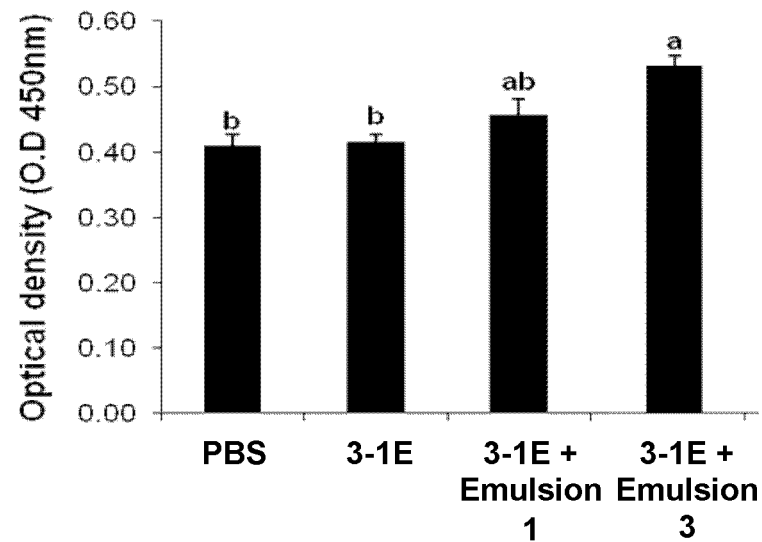


Figure 1 : Anticorps sériques anti-3-1E à J18 post vaccination, avant infection

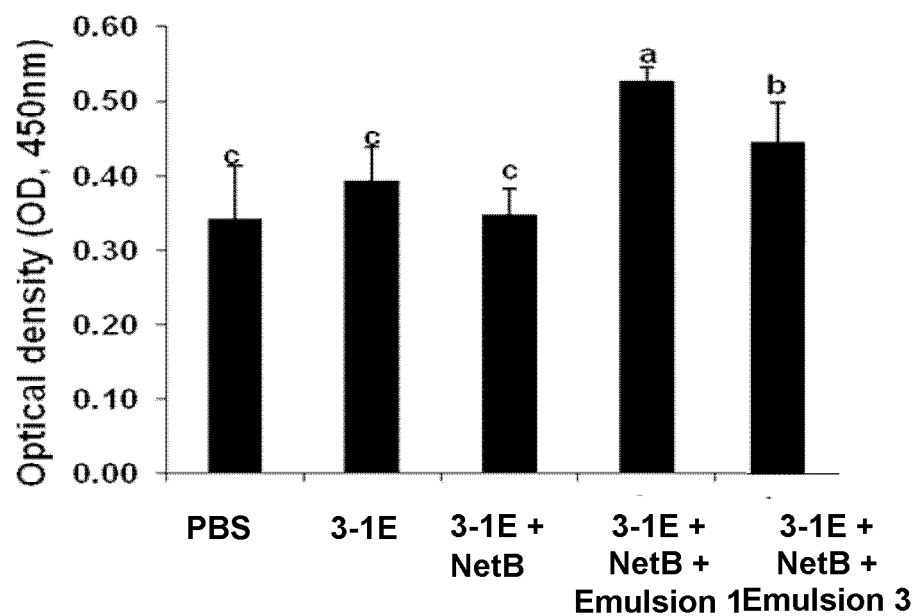


Figure 2 : Anticorps sériques anti-NetB à J18 post vaccination, avant infection

2/2

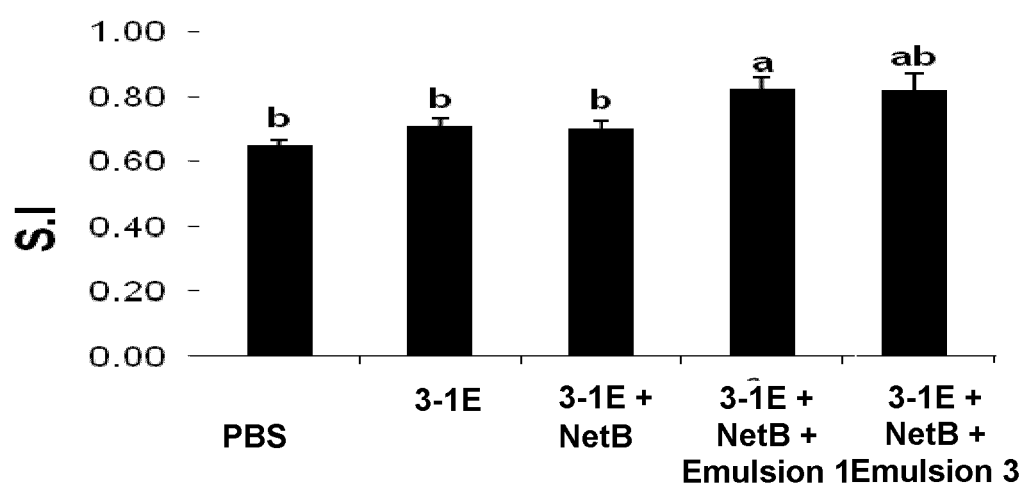


Figure 3 : Indice de stimulation spécifique des splénocytes par l'antigène NetB à 16 jours après vaccination



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 787534
FR 1360999

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2011/117507 A1 (SEPPIC SA [FR]; BERTRAND FRANCOIS [FR]; DEVILLE SEBASTIEN [FR]; DUPUIS) 29 septembre 2011 (2011-09-29)	1-9	A61K9/107 A61K39/39 A61P37/04
Y	* revendications ; pages 6-7 ; page 8, lignes 11-17 ; page 8, ligne 19 - page 9, ligne 7 ; tableau page 10 *	10-14	
X	WO 2011/117506 A2 (SEPPIC SA [FR]; BERTRAND FRANCOIS [FR]; DEVILLE SEBASTIEN [FR]; DUPUIS) 29 septembre 2011 (2011-09-29)	1-9	
Y	* pages 4-6 ; revendications ; exemples *	10-14	
X	EP 1 095 662 A1 (SEPPIC SA [FR]) 2 mai 2001 (2001-05-02) * revendications ; compositions C, M, W ; page 4, [0024], [0029] *	1,4,6,8	
Y	US 2007/243212 A1 (DOELLING VIVIAN W [US] ET AL) 18 octobre 2007 (2007-10-18) * revendications 30-42 ; page 13, [0136] ; exemples *	10-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 août 2014		Hennard, Christophe	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1360999 FA 787534

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **14-08-2014**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 2011117507 A1		29-09-2011	CN	102869380 A	09-01-2013
			EP	2550015 A1	30-01-2013
			FR	2957933 A1	30-09-2011
			RU	2012145081 A	27-04-2014
			US	2012321663 A1	20-12-2012
			WO	2011117507 A1	29-09-2011

WO 2011117506 A2		29-09-2011	EP	2550016 A2	30-01-2013
			FR	2957803 A1	30-09-2011
			RU	2012145084 A	27-04-2014
			US	2013011434 A1	10-01-2013
			WO	2011117506 A2	29-09-2011

EP 1095662 A1		02-05-2001	EP	1095662 A1	02-05-2001
			EP	2196216 A1	16-06-2010
			FR	2800280 A1	04-05-2001
			JP	4842430 B2	21-12-2011
			JP	2001151697 A	05-06-2001
			US	7422748 B1	09-09-2008
			US	2008187552 A1	07-08-2008

US 2007243212 A1		18-10-2007	AU	2007245198 A1	08-11-2007
			AU	2010212448 A1	09-09-2010
			AU	2010212449 A1	09-09-2010
			BR	PI0710023 A2	02-08-2011
			CA	2647939 A1	08-11-2007
			CN	101460192 A	17-06-2009
			EP	2004220 A2	24-12-2008
			JP	5014413 B2	29-08-2012
			JP	2009532353 A	10-09-2009
			JP	2010275313 A	09-12-2010
			KR	20080108142 A	11-12-2008
			KR	20120042865 A	03-05-2012
			RU	2008138702 A	10-04-2010
			RU	2010136627 A	10-03-2012
			RU	2010136629 A	10-03-2012
			US	2007243199 A1	18-10-2007
			US	2007243212 A1	18-10-2007
			US	2010136049 A1	03-06-2010
			US	2010143403 A1	10-06-2010
			WO	2007126816 A2	08-11-2007
